

**IL RUOLO DELLA TOMOGRAFIA E DELLA MICROSCOPIA
CONFOCALE NELLA VALUTAZIONE DELLE BOZZE
FILTRANTI DOPO INTERVENTO CHIRURGICO DI
GLAUCOMA MEDIANTE IMPIANTO EX-PRESS**

INDICE

1) RIASSUNTO	3
2) INTRODUZIONE	7
- 2a) Glaucoma primario ad angolo aperto	7
- 2b) Trattamento chirurgico del glaucoma	9
- 2c) Dispositivo Ex-Press	12
3) MATERIALI E METODI	22
- 3a) Pazienti	22
- 3b) Tomografia a coerenza ottica	24
- 3c) Microscopia confocale	35
- 3d) Analisi statistica	45
4) RISULTATI	46
5) DISCUSSIONE	59
6) BIBLIOGRAFIA	64

1) RIASSUNTO

Introduzione

Con il termine glaucoma vengono indicate un gruppo di neuropatie ottiche progressive che hanno in comune la lenta degenerazione delle cellule ganglionari retiniche e dei loro assoni, e che inducono alterazioni a livello della testa del nervo ottico con concomitante perdita della funzione visiva.

Gli interventi chirurgici volti a ridurre la pressione intraoculare nel glaucoma ad angolo aperto sono molteplici; l'impianto del dispositivo Express è attualmente uno dei più utilizzati sia per il ridotto grado di invasività dell'intervento, sia per l'ottima gestione post operatoria del paziente che consente. Rispetto all'intervento di trabeculectomia garantisce una minore incidenza di ipotono post-operatorio e di effusione coroideale favorendo un recupero più veloce dopo l'intervento.

Lo scopo di questa tesi è valutare da un punto di vista anatomico l'aspetto strutturale delle bozze post intervento di glaucoma con impianto Ex-press mediante l'utilizzo della Tomografia a Coerenza Ottica e della Microscopia Confocale.

Pazienti e metodi

Sono stati esaminati 86 occhi di 81 pazienti operati di glaucoma mediante impianto Ex-press fra il 2011 ed il 2013.

Le bozze sono state valutate mediante Tomografia a Coerenza Ottica (OCT) e mediante Microscopia Confocale.

I parametri presi in considerazione alla Tomografia sono stati: altezza della bozza, spessore della parete della bozza e riflettività della parete.

I parametri valutati con la Microscopia Confocale sono stati: numero di microcisti epiteliali e riflettività del tessuto connettivo subepiteliale.

Il tono endoculare è stato misurato prima e dopo l'intervento mediante tonometro ad applanazione di Goldmann.

L'analisi statistica dei dati raccolti è stata effettuata con il Mann-Whitney *U* Test; questo ha consentito di confrontare le bozze funzionanti con quelle funzionanti.

Risultati

L'età dei pazienti era compresa fra 51 ed 80 anni. I valori di pressione endoculare misurati prima dell'intervento variavano fra i 24 ed i 37

mmHg. In base ai valori di pressione misurati dopo l'intervento sono stati formati 2 gruppi: Gruppo 1 (bozze funzionanti) costituito dagli occhi presentavano una riduzione di almeno un terzo della tensione preoperatoria e Gruppo 2 (bozze non funzionanti) dove la riduzione della pressione ottenuta era meno di un terzo rispetto al valore preoperatorio. Il Gruppo 1 era formato da 39 bozze, Il gruppo 2 da 47 bozze.

In base all'analisi morfologica della bozza studiata con l'OCT il Gruppo 1 è stato suddiviso in bozze diffuse (14) e bozze cistiche (25). Il gruppo 2 è stato diviso in bozze incapsulate (37) e bozze piatte (10). Nel confronto fra bozze filtranti e non filtranti i parametri che sono risultati significativi sono stati: la riflettività della parete della bozza (all'analisi tomografica), il numero di microcisti per campo e la densità del tessuto connettivo congiuntivale (alla microscopia confocale).

Discussione

Da questo lavoro è emerso che le bozze filtranti post express hanno una bassa riflettività alla tomografia a coerenza ottica, hanno un elevato numero di microcisti per campo e una bassa densità del tessuto

connettivo congiuntivale. Quelle non funzionanti invece mostrano una elevata riflettività di parete, un ridotto numero di microcisti ed un connettivo subepiteliale più denso. Il connettivo congiuntivale quindi risulta essere il principale artefice del fallimento chirurgico post Express in quanto, nei casi in cui diviene maggiormente organizzato, va a formare un ostacolo alla filtrazione transcongiuntivale dell'umore acqueo deviato dalla camera anteriore.

Le immagini ottenute mediante OCT si sono rivelate molto utili nella valutazione post chirurgica delle bozze filtranti ed hanno fornito importanti indicazioni chirurgiche nei casi in cui è stato necessario eseguire un needling, un reintervento oppure una plastica congiuntivale per scorrimento. Inoltre hanno consentito di approfondire la conoscenza sul funzionamento del dispositivo, sulla reazione dei tessuti circostanti e sulle modifiche strutturali della bozza filtrante nel corso del tempo.

2) INTRODUZIONE

2a-Glaucoma primario ad angolo aperto

E' stato stimato che circa 66.8 milioni di persone nel mondo siano affette da glaucoma, ed il glaucoma è stata classificata come la seconda causa di cecità nel mondo.

Esistono vari tipi di glaucoma e sono classificati in: glaucoma congenito, glaucoma ad angolo aperto (forma primaria e forma secondaria)e glaucoma da chiusura angolare (forma primaria e forma secondaria). Fra tutti i tipi di glaucoma quello più rappresentato è il glaucoma ad angolo aperto e questo riguarda il 90% di tutti i casi. ¹

I glaucomi primari ad angolo aperto sono neuropatie ottiche croniche progressive che hanno in comune alterazioni morfologiche caratteristiche della testa del nervo ottico e dello strato delle fibre nervose retiniche, in assenza di altre malattie oculari o anomalie congenite; associata a queste alterazioni vi è la morte delle cellule ganglionari ed una perdita progressiva del campo visivo.² I principali fattori di rischio del glaucoma primario ad angolo aperto sono i seguenti: la pressione intraoculare elevata, l'età (nei soggetti anziani

c'è maggiore prevalenza della malattia), la familiarità positiva per la malattia glaucomatosa, la razza afro-caraibica, la miopia superiore alle quattro diottrie, il diabete.³

Il trattamento del glaucoma primario ad angolo aperto si basa sulla riduzione della pressione intraoculare; per ottenere questo obiettivo si possono adottare diverse strategie che di fatto sono rappresentate dalla terapia medica, dalla terapia laser e dalla terapia chirurgica. Tra queste opzioni non esiste una scelta terapeutica ideale e definitiva, il criterio decisionale si deve basare sul rapporto rischio beneficio: il trattamento deve preservare la funzione visiva senza alterare la qualità della vita del paziente e senza dare effetti collaterali locali e/o sistemici in modo da garantire una buona compliance.⁴ Seguendo le indicazioni delle linee guida per il glaucoma edite dalla Società Europea del Glaucoma, il primo approccio terapeutico è costituito dal trattamento farmacologico, che deve essere iniziato con una monoterapia da scegliere in base alle caratteristiche del paziente.⁵ L'obiettivo è quello di raggiungere la pressione target utilizzando il farmaco più sicuro per il paziente somministrato al dosaggio più basso possibile. Infatti il farmaco di prima scelta può essere un β -bloccante, un α_2 -agonista, un inibitore dell'anidrasi carbonica, una

prostaglandina o un prostamide, a seconda della pressione che si pensa di dover raggiungere. Quando la monoterapia intrapresa risulta insufficiente al raggiungimento della pressione target, bisogna cambiare il farmaco (sempre rimanendo in monoterapia). Solo successivamente si dovrebbero associare tra loro più molecole utilizzando chiaramente combinazioni farmacologicamente logiche (per es. molecole con diversi meccanismi d'azione) in numero massimo di tre. Se questa strategia risulta inefficace (pressione intraoculare non controllata, peggioramento del danno del nervo ottico, peggioramento del campo visivo, comparsa di effetti collaterali gravi, scarsa compliance) oppure se il paziente è scarsamente collaborante o infermo, si può eseguire un trattamento di Laser trabeculoplastica selettiva (se indicato nel caso specifico) o altrimenti si passa al trattamento chirurgico.

2b-Il trattamento chirurgico del glaucoma

Il trattamento chirurgico del glaucoma si basa sulla riduzione della pressione endoculare allo scopo di bloccare o rallentare la progressione del danno funzionale; inoltre il trattamento chirurgico

quando coronato da successo consente un controllo più efficace della pressione oculare rispetto al trattamento farmacologico.⁶ Esistono varie tipologie di intervento e si possono classificare a seconda del meccanismo con il quale raggiungono l'obiettivo pressorio: procedure che riducono la produzione di umore acqueo e procedure che ne aumentano il deflusso. Le prime sono riservate a casi più complessi e di fatto rappresentano un approccio più aggressivo mirato alla distruzione dei corpi ciliari. Queste procedure ciclodistruttive vengono di fatto utilizzate in stadi della malattia molto avanzati o in stadi terminali delle forme refrattarie con lo scopo prevalente di ridurre la sintomatologia algica in occhi non vedenti

Le seconde rappresentano la prima scelta in quanto più fisiologiche; possono essere suddivise in procedure ab esterno e procedure ab interno a seconda che l'approccio alle strutture angolari avvenga per via transcongiuntivale e sclerale o per via transcorneale attraverso la camera anteriore.

Una ulteriore suddivisione può essere fatta in base alla sede in cui viene fatto defluire l'umore acqueo; avremo quindi procedure filtranti (che deviano l'umore acqueo in uno spazio sottocongiuntivale), procedure che deviano l'umore acqueo nello spazio sovracoroideale e

procedure che mirano a ripristinare le vie fisiologiche di deflusso riaprendo il canale dello Schlemm.

Le filtranti inoltre a seconda che l'umore acqueo venga drenato dalla porzione anteriore o posteriore del bulbo sono distinte in filtranti anteriori e filtranti posteriori.⁷ Le filtranti anteriori infine possono essere distinte in penetranti o non penetranti a seconda che vi sia o meno un ingresso diretto in camera anteriore.

Le filtranti anteriori con approccio ab externo rappresentano attualmente il gold standard dell'approccio chirurgico al paziente glaucomatoso.

Storicamente l'intervento che per decenni ha dominato il panorama degli interventi chirurgici di glaucoma è stata la trabeculectomia.

Questa tecnica, descritta inizialmente da Sugar (1961) e successivamente perfezionata da Cairns e Watson (1968),⁸ si basa sulla creazione di una fistola sclero-corneale che permette la diffusione passiva di umore acqueo nello spazio sottocongiuntivale bypassando la via di deflusso fisiologica rappresentata dal trabecolato, dal canale di Schlemm e dalle vene episclerali. L'ostio chirurgico viene "protetto" da uno sportello sclerale di spessore ridotto che diminuisce il rischio di complicanze quali l'ipotonia, l'ipotalamia e

l'endoftalmite. Questa tecnica permette di raggiungere un soddisfacente controllo della pressione intraoculare a lungo termine nella maggioranza dei casi, anche se, in alcuni pazienti, può risultare necessario il reinserimento di una terapia farmacologica dopo la chirurgia, oppure intervenire più volte.

2c-Dispositivo Ex-Press

Negli ultimi anni l'introduzione della chirurgia "armata", ovvero l'impiego del dispositivo Ex-press, ha portato dei cambiamenti importanti nella chirurgia del glaucoma.

Il dispositivo

L'impianto Ex-press fa parte degli impianti drenanti, ovvero shunts dell'acqueo progettati per ridurre la pressione intraoculare attraverso il drenaggio dell'umore acqueo dalla camera anteriore ad uno spazio sottotenoniano-sottocongiuntivale.

Il dispositivo Ex-press è in grado di controllare e modulare grazie ad un particolare disegno del percorso idrodinamico interno , il deflusso dell'umore acqueo attraverso la fistola. Il mini-shunt è prodotto in acciaio inossidabile ad alta biocompatibilità (316 MVL) ed è

compatibile con la risonanza magnetica non essendo sensibile all'esposizione alla forza elettromagnetica. E' costituito da un "piatto" (Fig. 1), ovvero da una porzione molto appiattita munita di un orifizio centrale che assicura la stabilità del dispositivo e ne previene l'estrusione in camera anteriore, e da un tubicino (Fig 2). Quest'ultimo ha una lunghezza di 2.64 millimetri, è cavo al suo interno, in diretta continuità con l'ostio del piatto, e dispone di una punta obliqua smussa tagliata a becco di flauto.



Figura 1 [Vista posteriore del dispositivo Ex-press che mette in evidenza il "piatto".]



Figura 2 [Vista dall'alto del dispositivo Ex-press, si può osservare l'orifizio accessorio]

La punta del dispositivo è quella che sporge in camera anteriore ed oltre al foro centrale è munita di un doppio foro laterale che in caso di ostruzione del dotto principale consente comunque un flusso di acqueo. Il diametro del tubicino è di 50 o 200 microns (in questo lavoro è stato impiantato quello da 200 microns) ma al suo interno è presente una barra di restringimento del flusso che aumenta la resistenza al passaggio dei liquidi riducendo il rischio di ipotono (Fig. 3). La stabilità all'interno del bulbo oculare è assicurata da uno sperone metallico che ne impedisce l'estrusione dalla camera anteriore.



Figura 3 [Vista dell' dispositivo dall'orifizio principale; si può osservare la barra di restringimento del flusso]

Il deflusso dell'acqueo è regolato dal principio fisico espresso dalla legge di Hagen-Poiseuille, secondo la quale la caduta della pressione lungo il tubo è direttamente proporzionale alla viscosità del fluido (μ), alla lunghezza del tubo (l), e alla portata del flusso (V); è invece inversamente proporzionale al diametro del tubo (S).

$$\Delta p = 8\mu \frac{l}{\pi R^4} \dot{V} = \frac{8\pi \mu l}{S^2} \dot{V}$$

Il principio di funzionamento è quindi simile a quello della trabeculectomia, in quanto l'umore acqueo viene derivato dalla camera anteriore verso un "serbatoio" sottocongiuntivale (Fig. 4).

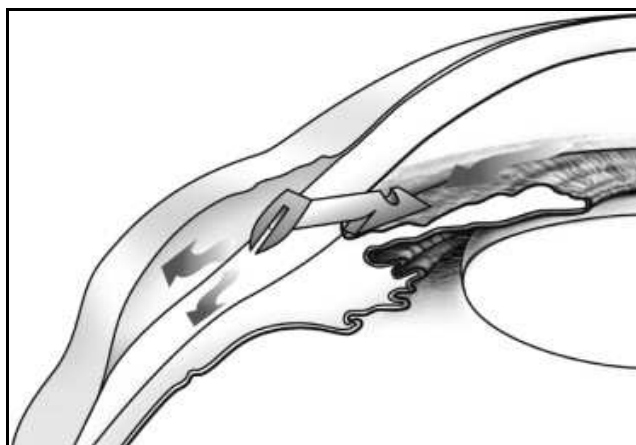


Figura 4 [Funzionamento del dispositivo; l'umore acqueo viene deviato nello spazio sottocongiuntivale]

Una volta deviato in questa area virtuale l'umore acqueo viene continuamente evacuato da questo spazio mediante tre vie: via transvenosa, via transcongiuntivale e via linfatica.

Per quanto riguarda la via transvenosa già nel 1977 Tenner e coll.⁹ dimostrarono tramite iniezione di fluoresceina in camera anteriore il passaggio dell'umore acqueo accumulato nello spazio sottocongiuntivale attraverso le vene acquose e da lì tramite le vene episclerali alla circolazione sistemica.

La via transcongiuntivale è stata evidenziata per la prima volta da Kronfeld¹⁰ nel 1952; egli infatti dimostrò come l'umore acqueo fosse

presente all'interno delle lacrime dei pazienti che erano stati sottoposti a chirurgia filtrante. Più recentemente Labbè e coll.¹¹ hanno ipotizzato che il passaggio transconiuntivale dell'acqueo avvenga tramite le cellule mucipare dell'epitelio congiuntivale. Le microcisti infatti sembrerebbero costituite dalla confluenza di cellule mucipare "modificate", cioè a scarso contenuto di mucina poiché diluita dall'umore acqueo che viene richiamato dalla stessa in quanto molecola idrofilica.

L'altra via di riassorbimento è rappresentata dai linfatici congiuntivali. Essi infatti riassorbono i fluidi interstiziali e aumentano la sorveglianza immunologica; è importante che la bozza sia circondata da una fitta rete di vasi linfatici sani che provvedano a un riassorbimento dell'umor acqueo.

L'umore acqueo normalmente non viene mai in contatto con altre strutture, ma rimane sempre entro un circuito chiuso che dal trabecolato, tramite il passaggio nel canale di Schlemm raggiunge la circolazione sistemica. Questo consente di mantenere un privilegio immunitario dell'umor acqueo, che quindi è isolato dal torrente ematolinfatico e risulta inerte.

Con un intervento di chirurgia filtrante è chiaro che questo meccanismo venga modificato, difatti si ha una rottura della barriera ematoacquea con contatto dell'acqueo glaucomatoso con la subcongiuntiva e conseguente perdita del privilegio immunitario.

L'acqueo glaucomatoso contiene numerose citochine infiammatorie pro-fibrotiche ed è fondamentale che vengano rimosse per evitare che la bozza si cicatrizzi troppo velocemente.

Rispetto alla trabeculectomia l'Ex-press fornisce dei vantaggi¹²: offre una resistenza fissa al flusso (poiché non risente della variabilità dell'apertura dell'ostio), è una procedura standardizzabile, è meno invasiva in quanto non c'è l'iridectomia con il conseguente rilascio di citochine proinfiammatorie, lo stimolo alla cicatrizzazione è ridotto, si può rimuovere in caso di complicazioni, permette di lavorare praticamente a camera chiusa (evitando complicanze intraoperatorie come l'incarceramento dell'iride nel sito della trabeculectomia). Inoltre si riduce l'incidenza di emorragie e flogosi in camera anteriore poiché non si viene a creare una ferita in diretta comunicazione con la stessa.

L'intervento

Controindicazioni assolute: angolo stretto o chiuso, presenza di uveite, glaucoma neovascolare.

Controindicazioni relative: blefariti croniche, dislacrimie medio-gravi, glaucoma post traumatico.

Si effettua una piccola peritomia congiuntivale nel settore supero nasale, si inietta BSS attraverso la peritomia con ago da 25 Gauge e si procede ad una idrodissezione della capsula del Tenone. Successivamente si procede alla apertura della congiuntiva al limbus superiore in modo da formare una tasca congiuntivale a base fornice. Si effettua quindi una cauterizzazione superficiale della sclera in modo da evitare sanguinamenti nelle fasi successive. Si procede quindi alla scolpitura dello sportello sclerale andando ad incidere il lato libero dello stesso a circa 4mm dal limbus. Successivamente si applica Mitomicina C alla concentrazione di 0.2 mg/ml mediante l'utilizzo di micro spugne imbevute andandole a posizionare sotto lo sportello e sotto la tasca congiuntivale. Si tiene chiusa con le pinze la tasca congiuntivale, si lava la cornea dall'eccesso di Mitomicina C e si attendono 2 minuti. Una volta passato il tempo si rimuovono le spugne e si procede a completare la scolpitura dello sportello e si crea il

tramite attraverso il quale passare il tubicino del dispositivo Ex-Press mediante ago da 27 Gauge. Quest'ultimo infatti, una volta sollevato lo sportello sclerale, viene inserito in prossimità del trabecolato (visto in trasparenza) e viene spinto in camera anteriore. A questo punto mediante il proprio iniettore il dispositivo Ex-press viene impiantato nel tramite appena fatto ed ancorato ai tessuti grazie allo sperone in acciaio. Il piatto dell'Ex-press risulta quindi disposto parallelamente al letto sclerale ed il tubicino sporge in camera anteriore (Fig. 5). Si procede quindi al passaggio delle suture rilasciabili in Nylon 10.0 che provvedono a limitare la filtrazione del dispositivo nell'immediato post operatorio andando a fissare lo sportello sclerale al tessuto circostante. Infine si chiude la congiuntiva con seta 8.0 e si fissa al limbus con una sutura continua in nylon 10.0.

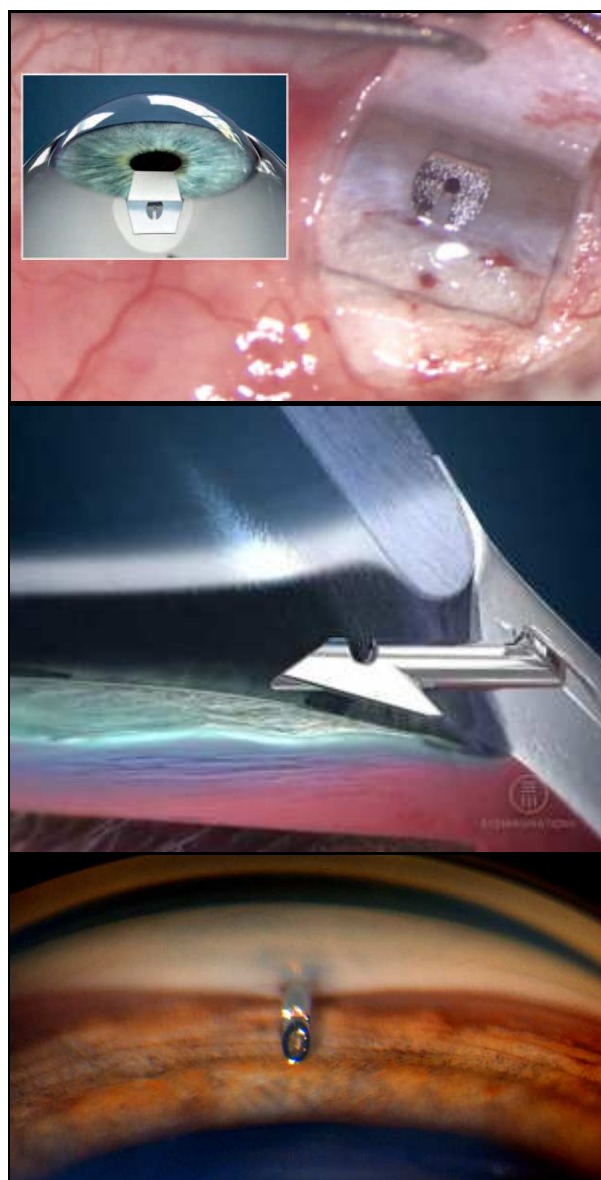


Figura 5 [Nel riquadro superiore si osserva il piatto del dispositivo che poggia sul letto sclerale; nel riquadro intermedio si vede il dispositivo che sporge in camera anteriore; nel riquadro inferiore si apprezza l'orifizio principale del dispositivo in una immagine gonioscopica]

3) MATERIALI E METODI

3a-Pazienti

In questo lavoro abbiamo esaminato 86 occhi di 81 pazienti di razza caucasica operati di glaucoma mediante impianto Ex-press, eseguito come sopra descritto, fra il 2011 e il 2013.

I soggetti inclusi nello studio erano pazienti affetti da glaucoma cronico ad angolo aperto che nonostante la terapia farmacologica massimale presentavano una progressione del danno glaucomatoso ed un graduale peggioramento del campo visivo.

I criteri di esclusione utilizzati sono stati i seguenti: glaucoma ad angolo stretto, glaucoma congenito, uveite, glaucoma neovascolare, pregressi interventi chirurgici per glaucoma (trabeculectomia, impianto valvolare, ecc.), pregressi interventi parachirurgici (Argon Laser Trabeculoplastica, Laser trabeculoplastica Selettiva).

Prima dell'intervento è stata misurata la pressione endoculare mediante tonometro ad applanazione di Goldmann.

Dopo l'intervento è stata nuovamente misurata la pressione endoculare con la medesima tecnica al fine di dividere i pazienti in

due gruppi in base alla riduzione del tono oculare ottenuta con l'impianto del dispositivo Ex-press. Come criterio di successo dell'intervento è stata presa una riduzione di almeno un terzo della tensione endoculare preoperatoria (senza utilizzo di farmaci). Come criterio di fallimento quindi è stata considerata una riduzione di meno di un terzo della tensione preoperatoria.

Nel corso della visita post-operatoria i pazienti sono stati osservati alla lampada a fessura e sono stati sottoposti ad analisi in vivo con microscopia confocale e tomografia a coerenza ottica del segmento anteriore. Dopo aver eseguito questi esami sono state formate delle ulteriori sottocategorie in base all'aspetto morfologico delle bozze.

3b Tomografia a Coerenza Ottica

Principi e funzionamento

La visualizzazione della morfologia strutturale della bozza post intervento di chirurgia filtrante è stata eseguita per la prima volta grazie alla biomicroscopia ad ultrasuoni (UBM)¹³. Mediante questa analisi strumentale è stata fin da subito evidenziata l'importanza di due parametri: la riflettività della bozza e la presenza dello spazio filtrante sotto la parete della stessa. L'UBM però è una indagine invasiva, necessita del contatto della sonda con l'occhio del paziente, è operatore dipendente ed ha una risoluzione assiale che non supera i 25 microns.

Con l'avvento della tomografia a coerenza ottica (OCT) la valutazione anatomica delle bozze è cambiata in virtù di un esame non invasivo, non a contatto (elemento importante in quanto non si alterano meccanicamente le strutture più delicate e si riduce il rischio di infezioni post-operatorie), di rapida esecuzione, non operatore dipendente, in grado di fornire immagini ad alta risoluzione e che consente una ricostruzione tridimensionale della zona di tessuto analizzata.

La microscopia a coerenza ottica (Optical Coherence Tomography OCT) è una tecnica per immagini che ha fatto il suo ingresso nel campo della clinica medica nel 1991. La diagnostica per immagini tramite OCT è analoga a all'ultrasonografia B-mode eccetto per il fatto che sfrutta la luce invece che gli ultrasuoni. Questo dispositivo infatti è in grado di fornire immagini sotto forma di sezioni trasversali misurando il ritardo dell'eco e l'intensità della luce diffusa o della luce riflessa dalle microstrutture proprie del tessuto in esame. Il modo con cui si riesce a rilevare l'intensità degli echi luminosi retrodiffusi è l'utilizzo di un interferometro.

A partire da una sorgente luminosa a banda larga viene prodotto un raggio, questo viene separato in due da uno specchio semiriflettente, una parte si dirige verso il tessuto, mentre l'altra va verso uno specchio di riferimento. I tessuti del campione esaminato, una volta irradiati dal fascio di luce diretto verso di essi, producono echi luminosi retrodiffusi che viaggiano indietro in direzione dello specchio semiriflettente; qui si combinano con il fascio luminoso di riferimento riflesso dallo specchio di riferimento. Quando i due impulsi si sovrappongono producono un fenomeno noto come interferenza che viene misurata da un fotorivelatore. Questo si verifica

però solamente quando le distanze percorse dal fascio di riferimento e dalla retrodiffusione sono uguali.

Lo specchio di riferimento oscilla tra un minimo e un massimo (a distanze conosciute dal software) per permettere di acquisire tutti gli echi alle varie profondità del tessuto; infatti si varia la posizione dello specchio di riferimento in modo che il ritardo dell'eco luminoso dei tessuti coincida con esso . Questo è il tipico funzionamento di un OCT Time Domain.

Il meccanismo sopra illustrato però limita ampiamente la velocità della acquisizione per la presenza di elementi mobili, esponendo le immagini ottenute ad aberrazioni legate al movimento oculare.

Nel 2006 è stata messa a punto una nuova tecnica di acquisizione detta Spectral Domain. Questa differisce dalla precedente per due motivi: lo specchio di riferimento è fisso ed il braccio di esplorazione è dotato di uno spettrometro che misura la differenza fra le lunghezze d'onda della radiazione del braccio di riferimento e quella che torna dal tessuto (Fig. 6).

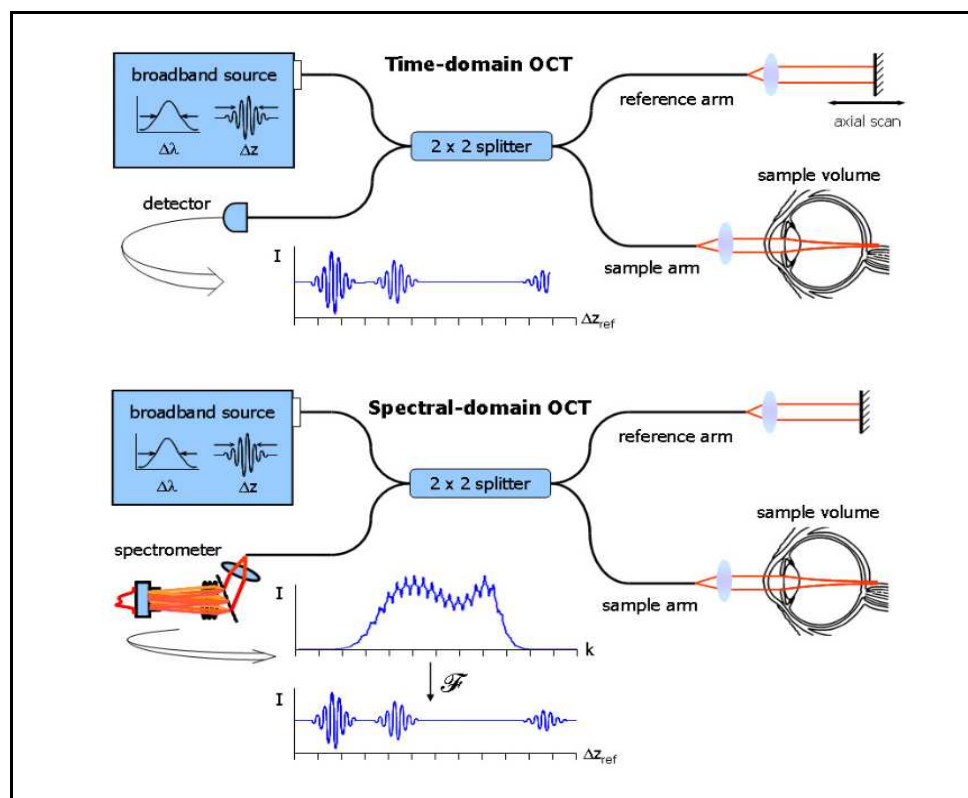


Figura 6 [Principio di funzionamento dell'OCT Time-domain e Spectral-domain]

Il tomografo utilizzato in questo lavoro è l'OCT Topcon 3D 1000, un OCT Spectral Domain, che grazie al software per il segmento anteriore è in grado di eseguire una analisi dettagliata della cornea e delle strutture circostanti. Lo strumento è in grado di fornire immagini di alta qualità riuscendo ad acquisire scansioni con una risoluzione orizzontale minore o uguale a 20 microns ed una risoluzione longitudinale di 5 microns. Inoltre il tempo di acquisizione delle scansioni è molto breve: 0.05 secondi per un B-scan, 2.8 secondi per un 3D-scan e 20.000 A-scan al secondo.

Il segnale tomografico viene generato tramite un diodo superluminescente (SLD) con lunghezza d'onda di 840 nm, ampiezza di banda di 50 nm e potenza sulla cornea inferiore a 0.65 mW.

Inizialmente nato per l'analisi delle strutture retiniche, grazie all'implemento del software per il segmento anteriore, il tomografo è in grado di delineare le strutture interne delle bozze in base alle differenti proprietà ottiche dei tessuti analizzati.

Metodi di acquisizione utilizzati

Per eseguire l'esame tomografico della bozza i pazienti sono stati posizionati davanti all'ottica dello strumento con il mento e la fronte appoggiati negli appositi spazi in modo da limitare i movimenti in senso antero-posteriore durante l'acquisizione delle immagini. Al fine di esporre in maniera ottimale la parte di congiuntiva da analizzare è stato chiesto ai pazienti di guardare verso il basso mentre un assistente dell'operatore teneva delicatamente sollevata la palpebra senza premere sul bulbo oculare.

Sono stati utilizzati due metodi di scansione: il metodo radiale, con centro di rotazione a livello del flap sclerale, linea di scanning di 6.0 mm e scan resolution di 1024, ed il metodo a griglia 3D con linea di

scanning di 6.0 x 6.0 mm e scan resolution di 512 x 128. Il metodo a griglia 3D consente l'elaborazione tridimensionale della bozza e permette l'estrapolazione di immagini verticali (asse Y), orizzontali (asse x) e coronali (asse z).

Questa metodica ci ha permesso di analizzare morfologicamente le seguenti strutture: il piatto del dispositivo Ex-press (ben riconoscibile in quanto per la sua composizione viene visualizzato come un elemento ad alta riflettività), il flap sclerale, l'accumulo di liquido sopra il flap sclerale (quando presente), la parete della bozza e le eventuali microcisti sottocongiuntivali presenti (Fig. 7).

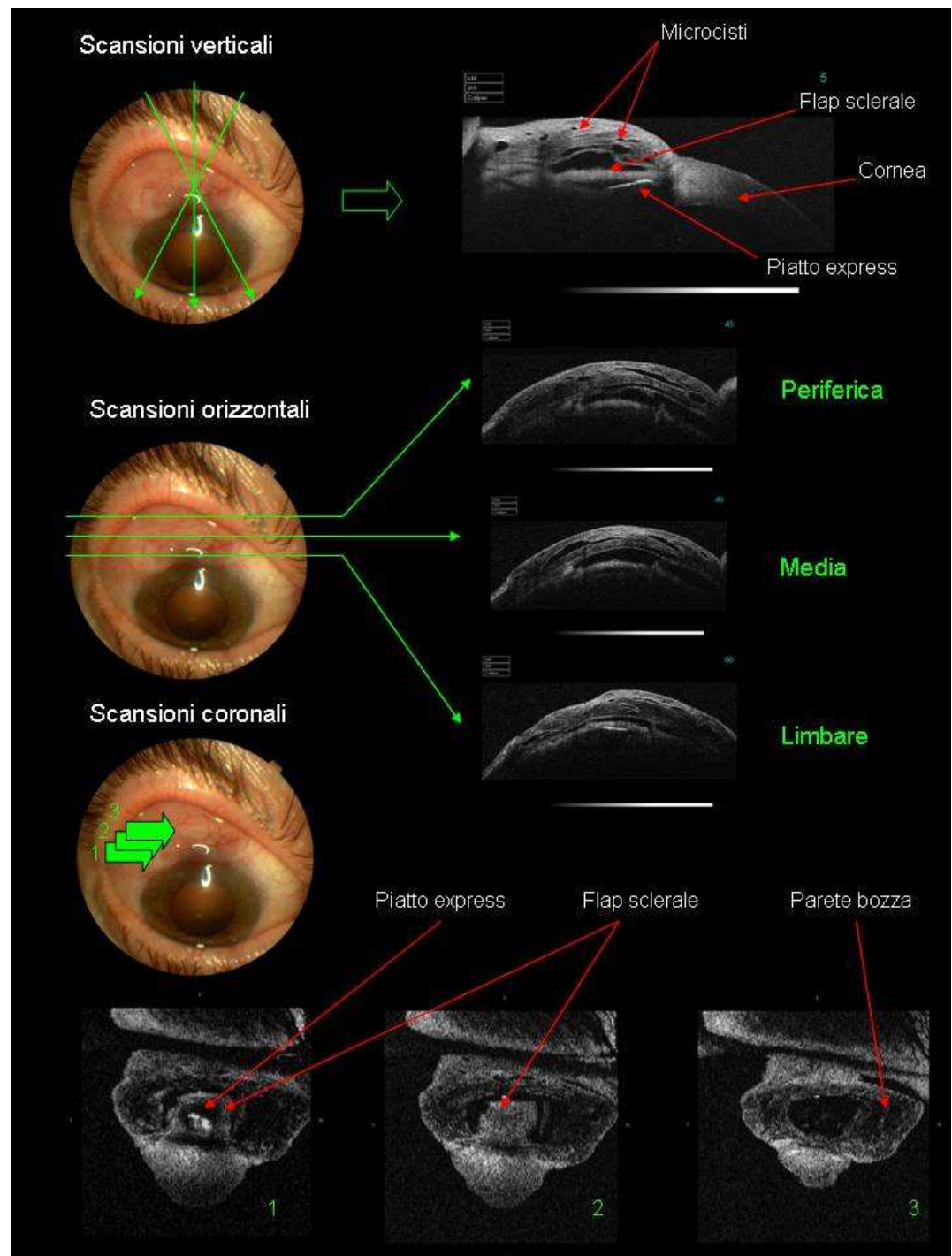


Figura 7 [Tecniche di scansione utilizzate e relative immagini ottenute]

Nelle scansioni radiali che intercettano il limbus e nelle scansioni lungo l'asse y possiamo osservare (Fig. 8): la posizione del piatto

dell'express, il flap (quando visibile), l'accumulo di liquido sopra il flap (se presente) e la struttura della parete della bozza. Grazie a queste scansioni possiamo vedere inoltre se a livello del flap si è sviluppata una reazione fibrotica oppure se esso è adesivo o meno alla parete della bozza.

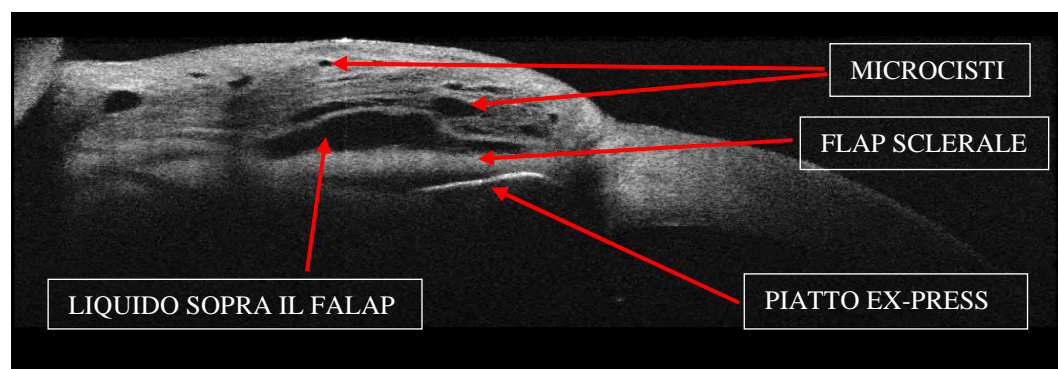


Figura 8 [Scansione radiale che intercetta il limbus e relative strutture visualizzate]

Le scansioni orizzontali consentono di andare a studiare la struttura della bozza dal limbus alla periferia. Effettuando scansioni a livello limbare (Fig 9) si osserva: il piatto dell'express, il flap sclerale soprastante, l'accumulo di liquido soprasclerale e la parete della bozza.

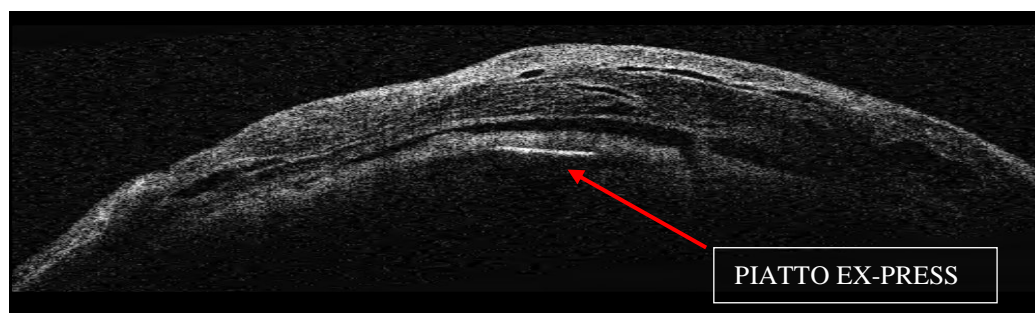


Figura 9 [Scansione orizzontale a livello del limbus; piatto express ben evidente]

Nelle scansioni effettuate a livello del centro della bozza (Fig 10) ed in periferia (Fig 11) il piatto dell'express non è più visualizzabile (essendo situato inferiormente) ma si possono vedere le altre componenti della bozza e soprattutto si possono ottenere informazioni importanti in caso di bozza diffusa con filtrazione posteriore. Entrambe le scansioni sono in grado di mettere in evidenza la presenza di micro e macro cisti sottocongiuntivali.

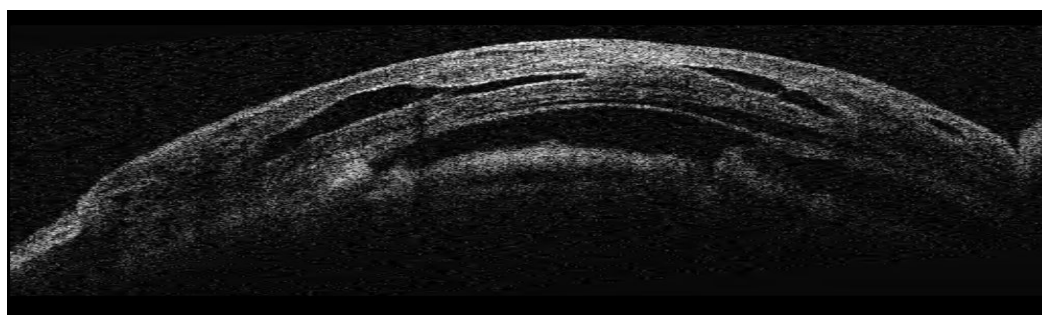


Figura 10 [Scansione orizzontale centrale; piatto express non più evidente]

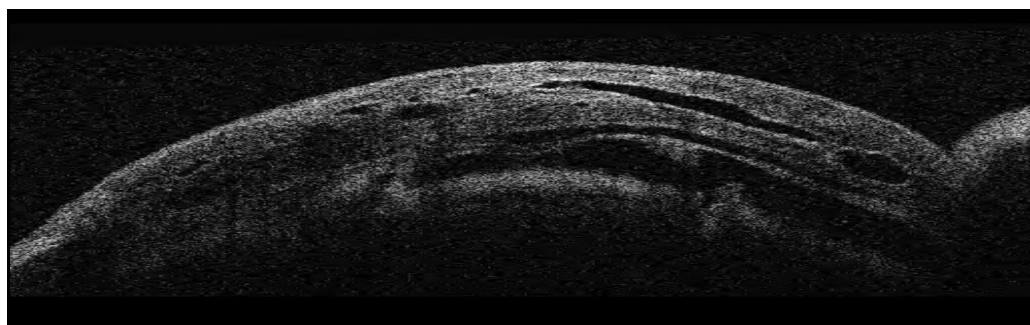


Figura 11 [Scansione orizzontale periferica; piatto express non più evidente]

Grazie alle scansioni coronali (lungo l'asse z) ricavate dalla ricostruzione tridimensionale siamo in grado di valutare soprattutto la lunghezza e la larghezza del flap ed eventuali reazioni fibrose che si possono sviluppare a questo livello; inoltre si può osservare come varia lo spessore della parete della bozza a vari livelli di altezza partendo dalla base e proseguendo verso l'apice della stessa (Fig 12).

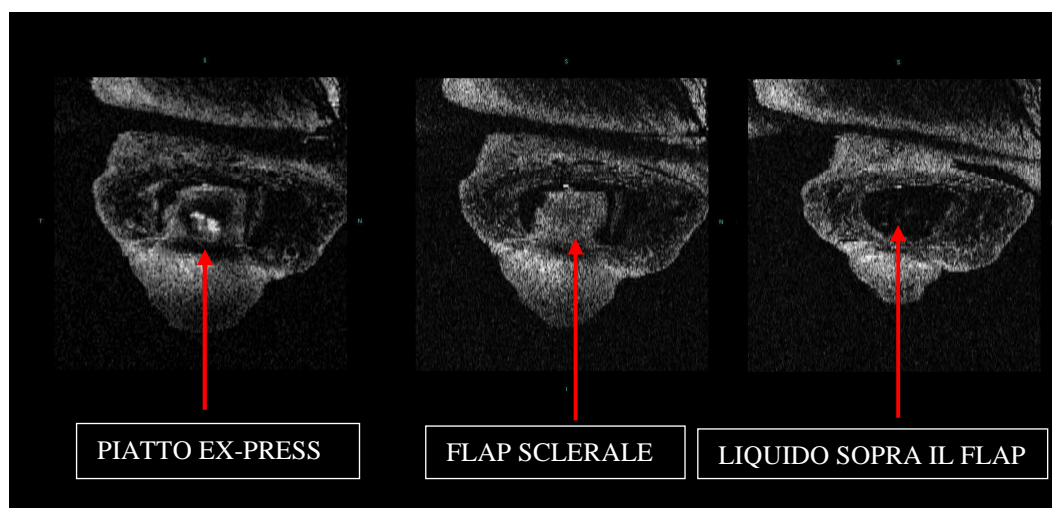


Figura 12 [Scansioni coronali; da sinistra verso destra le sezioni si spostano dalla base verso l'apice della bozza]

Con l'ausilio del software incorporato nello strumento abbiamo effettuato varie misurazioni; in accordo con quanto suggerito dalla letteratura in termini di significatività¹⁴⁻¹⁵, i parametri misurati sono stati i seguenti: lo spessore della parete della bozza, la massima altezza interna e la riflettività della parete.

Lo spessore della parete è stato calcolato nel punto più spesso posizionando il calibro fra la faccia esterna e la faccia interna (quella che guarda verso il liquido soprasclerale). La massima altezza interna della bozza è la distanza che intercorre fra la faccia interna della parete e lo sportello sclerale. Per quanto riguarda la riflettività della parete sono state analizzate le immagini a falsi colori ottenute dal tomografo; come in altri studi¹⁵ abbiamo stabilito un grading: da nero a blu assenza di riflettività o bassa riflettività (Grado 1), da verde a giallo moderata riflettività (Grado 2), rosso alta riflettività (grado 3). Le misurazioni sono state effettuate sulla miglior immagine radiale intercettante il limbus ottenuta su una serie di tre scansioni

3c Microscopia confocale

Principi e funzionamento

Il primo microscopio confocale a scansione è stato costruito nel 1968 e questo dispositivo per la prima volta ha consentito la visualizzazione in vivo delle strutture cellulari dei tessuti analizzati.

Nel corso degli anni questo strumento è andato in contro ad una progressiva evoluzione tecnologica permettendo il raggiungimento di immagini qualitativamente sempre maggiori.

Negli anni 90 è stato prodotto il primo confocale “slit-scanning” che utilizza una lampada alogena ed acquisisce immagini di strati tissutali in sequenza a diversa profondità muovendosi automaticamente con steps di 5-10 microns. Il rapido movimento attraverso i vari piani confocali, utilizzato per ridurre la distorsione dell’immagine provocata dai movimenti dell’occhio, porta però ad una perdita di risoluzione spaziale.

Nel 2004 è stata introdotta la microscopia confocale a scansione laser che si basa appunto sulla gestione di un fascio di luce prodotta da una sorgente laser. La luce laser prodotta viene indirizzata tramite uno specchio verso l’apertura dello strumento e viene convogliata tramite

un sistema di diaframmi in un punto preciso all'interno dell'oggetto esaminato. Questa luce consiste in una onda elettromagnetica con una determinata lunghezza d'onda; questa onda quando attraversa i tessuti analizzati (cornea, congiuntiva, limbus, ecc) in parte continua il suo tragitto indisturbata, in parte viene riflessa, ed in parte viene deviata nel suo percorso dalle varie interfacce che presentano indici di rifrazione differenti.

Nella microscopia confocale solamente la porzione dell'onda che viene riflessa e quindi torna verso la sorgente contribuisce a formare l'immagine finale. Le interfacce principali che troviamo nella cornea e nella congiuntiva sono costituite da: giunzioni citoplasmatiche, fluidi extracellulari, membrane ricche di lipidi, bordi cellulari, membrane nucleari e membrane mitocondriali. La luce riflessa è separata grazie ad uno specchio dal fascio di luce incidente e viene indirizzata verso un secondo diaframma dove è posizionato un rivelatore fotosensitivo (Fig13).

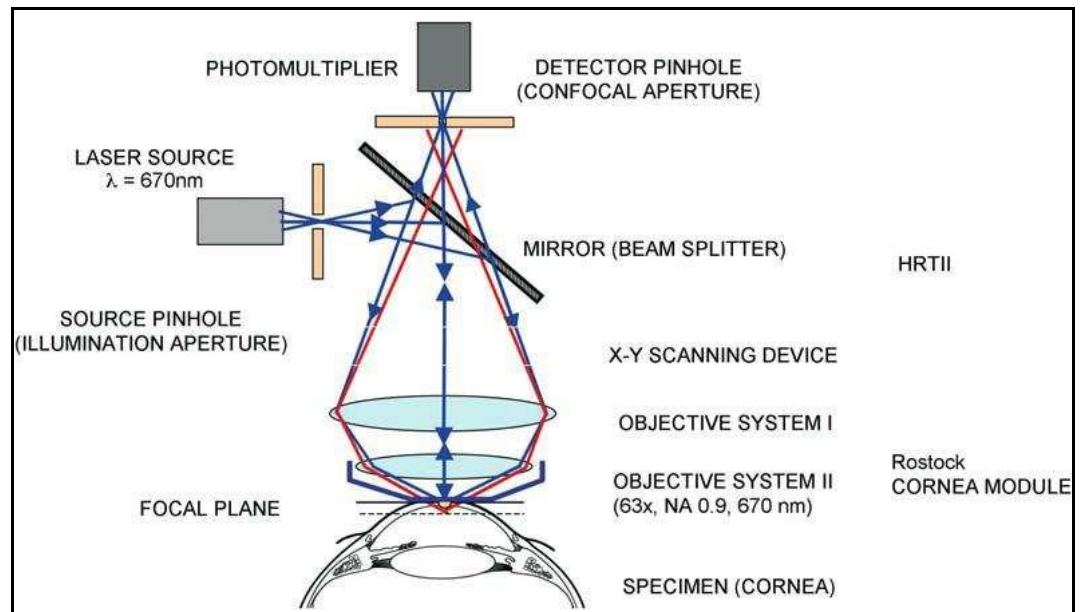


Figura 13 [Il principio di funzionamento della microscopia confocale ed i vari componenti]

Il sistema di ottiche è costruito in modo da sopprimere gran parte della luce che origina al di fuori del piano focale, quindi solamente gli impulsi provenienti dallo strato dove è convogliato il fascio laser contribuiscono a formare l'immagine.

Lo strumento utilizzato in questo studio è un microscopio confocale a scansione laser: Heidelberg Retina Tomograph 3 (HRT3) con il Rostock Cornea Module (RCM) (Fig 14).

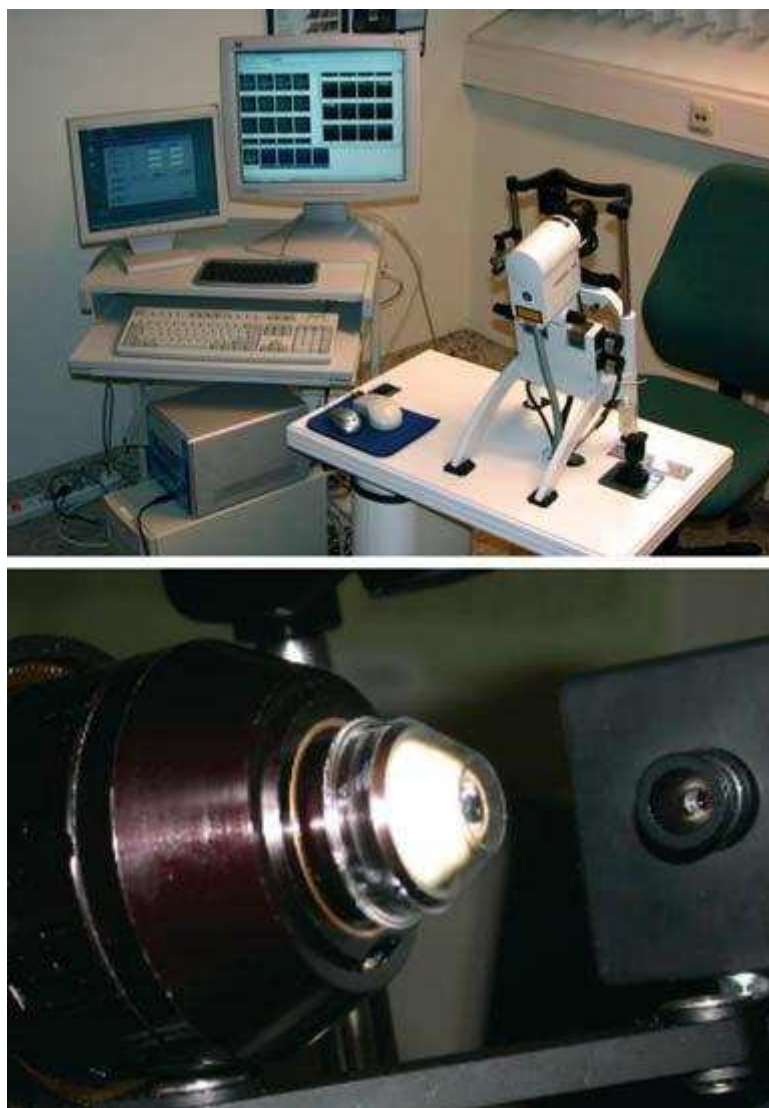


Figura 14 [In alto Heidelberg Retina Tomograph 3 (HRT3); in basso vista da vicino del Rostock Cornea Module (RCM)]

Il modulo cornea (RCM) è costituito da un sistema di ottiche intercambiabili che consentono di ottenere immagini di dimensioni diverse; noi abbiamo utilizzato un ottica con un campo di visualizzazione di 300 x 300 microns. Lo strumento entra a contatto con la superficie oculare mediante l'interposizione di un TomoCap, un

cappuccio rigido di polimetil metacrilato (PMMA), che determina una appianazione transitoria dei tessuti esaminati. Gli occhi analizzati sono stati precedentemente anestetizzati mediante l'instillazione di Oxibuprocaina Cloridrato allo 0,4% (Novesina®, Novartis Farma spa, Roma, Italia). Tra il TomoCap e l'ottica del modulo cornea (RCM) abbiamo messo un gel con coefficiente di rifrazione molto simile all'acqua (Viscotirs 0.2% Gel Oftalmico®, CIBA Vision Ophtalmics, Marcon, Venezia, Italia). In Questo modo si viene a formare un sistema diottrico in grado di garantire un'alta risoluzione ed un maggior contrasto poiché rispetto ad un sistema non a contatto possiamo ottenere un maggior numero di aperture (Fig 15).

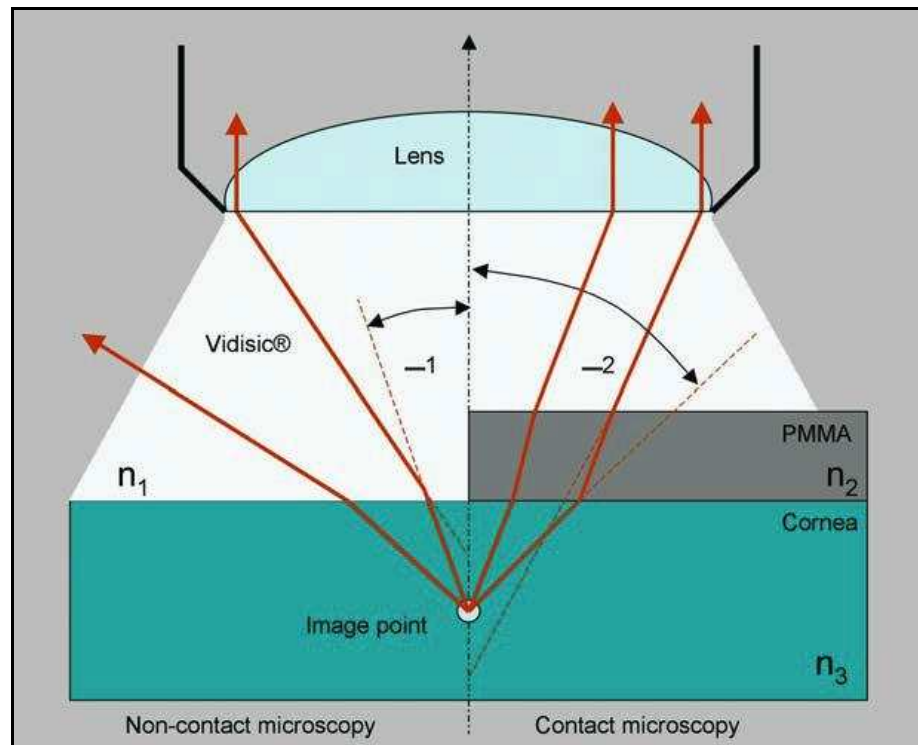


Figura 15 [Come varia il numero di aperture una volta che fra la cornea la lente del microscopio viene interposto il complesso formato dal gel e dal Tomo Cap]

La messa a fuoco dei diversi piani avviene manualmente, è operatore dipendente e consente di spostarsi lungo l'asse Z con steps di 1-2 microns (ciò è reso possibile da una elevatissima risoluzione di profondità).

Lo strumento consente di analizzare la cornea e la congiuntiva da un punto di vista ultrastrutturale valutando le strutture cellulari ed extracellulari sia da un punto di vista qualitativo che da un punto di vista quantitativo.

Metodi di acquisizione utilizzati

Nel nostro studio il paziente è stato posizionato davanti al microscopio confocale con mento e fronte appoggiati negli appositi spazi e l'occhio è stato allineato grazie ad una videocamera digitale compresa nel modulo cornea che fornisce una visualizzazione laterale in diretta della superficie della cornea e della superficie anteriore del Tomocap. E' stato chiesto al paziente prima di guardare dritto in modo da allineare e appoggiare la sonda RCM alla cornea, e poi di guardare verso il basso; in questo modo il bordo superiore della palpebra viene sollevato dal TomoCap e la bozza viene esteriorizzata. Sono state eseguite molteplici scansioni a fine di esaminare la maggior parte della superficie della bozza procedendo dal limbus verso l'alto, fin tanto che è stato possibile ottenere immagini qualitativamente soddisfacenti. In ogni regione esaminata le scansioni sono state effettuate partendo dalla congiuntiva ed andando in profondità verso la sclera (focalizzando manualmente i vari strati) procedendo a steps di 1-2 microns fin quanto è stato possibile acquisire immagini dettagliate.

Le immagini che sono state utilizzate per i nostri calcoli sono quelle acquisite a 2 mm circa dal limbus, nel centro virtuale della bozza.

Le strutture esaminate con attenzione sono state l'epitelio congiuntivale ed il tessuto connettivo subepiteliale.

L'aspetto dell'epitelio superficiale della congiuntiva bulbare alla microscopia confocale in soggetti normali è caratterizzato dalla presenza di nuclei cellulari rotondeggianti grigio chiaro circondati da un citoplasma più scuro a sua volta delimitato da un bordo cellulare molto più chiaro (Fig 16).

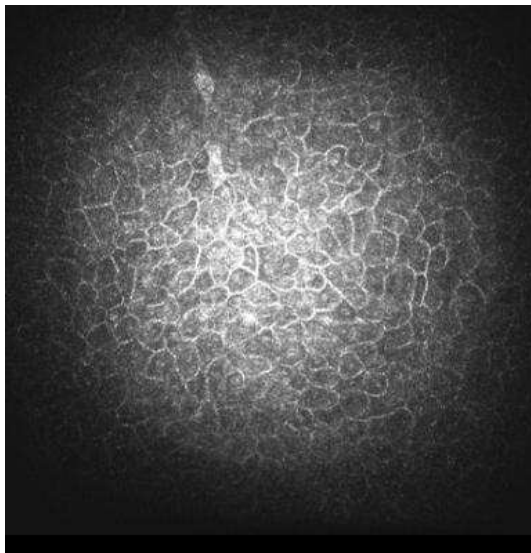


Figura 16 [Aspetto alla microscopia confocale dell'epitelio della congiuntiva bulbare in un occhio sano]

Nel contesto di questa struttura nei pazienti sottoposti ad interventi di chirurgia filtrante si apprezzano delle lacune iporiflettenti ovalari di aspetto irregolare definite “microcisti epiteliali”¹⁶ (Fig 17). In questo studio abbiamo valutato il numero di microcisti per campo; ovvero per ogni scansione eseguita rispettivamente vicino al limbus, al centro

della bozza ed il periferia, abbiamo selezionato l'immagine con il maggior numero di microcisti ed abbiamo calcolato la media tra le tre.

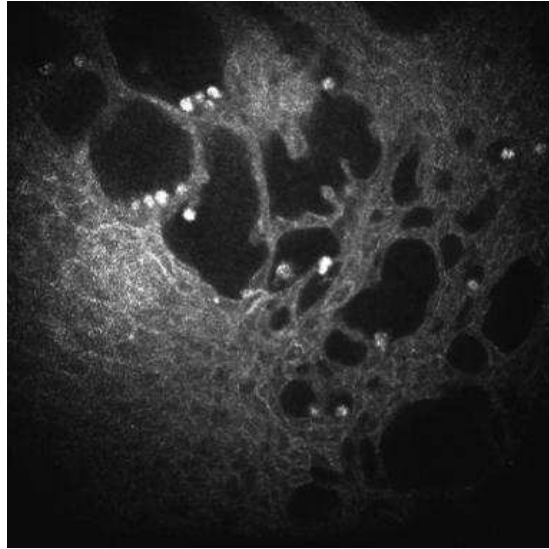


Figura 17 [Microcisti epiteliali diffuse a livello dell'epitelio congiuntivale visualizzabili dopo intervento di chirurgia filtrante]

Il tessuto connettivo subepiteliale è una struttura complessa che all'analisi confocale appare con un aspetto molto variegato anche nei soggetti normali. E' caratterizzato da uno strato più superficiale di aspetto grigio pallido con qualche elemento lineare misto ad elementi rotondeggianti di aspetto iperriflettente, ed uno strato più profondo formato da tralci lineari con andamento disordinato di aspetto iperriflettente.

In accordo con studi precedenti¹⁵⁻¹⁶ il parametro che abbiamo deciso di analizzare è la densità del connettivo di questo strato (valutata in

termini di riflettività): grado 0 scarsa densità, grado 1 media, grado 2 moderata, grado 3 elevata (Fig 18).

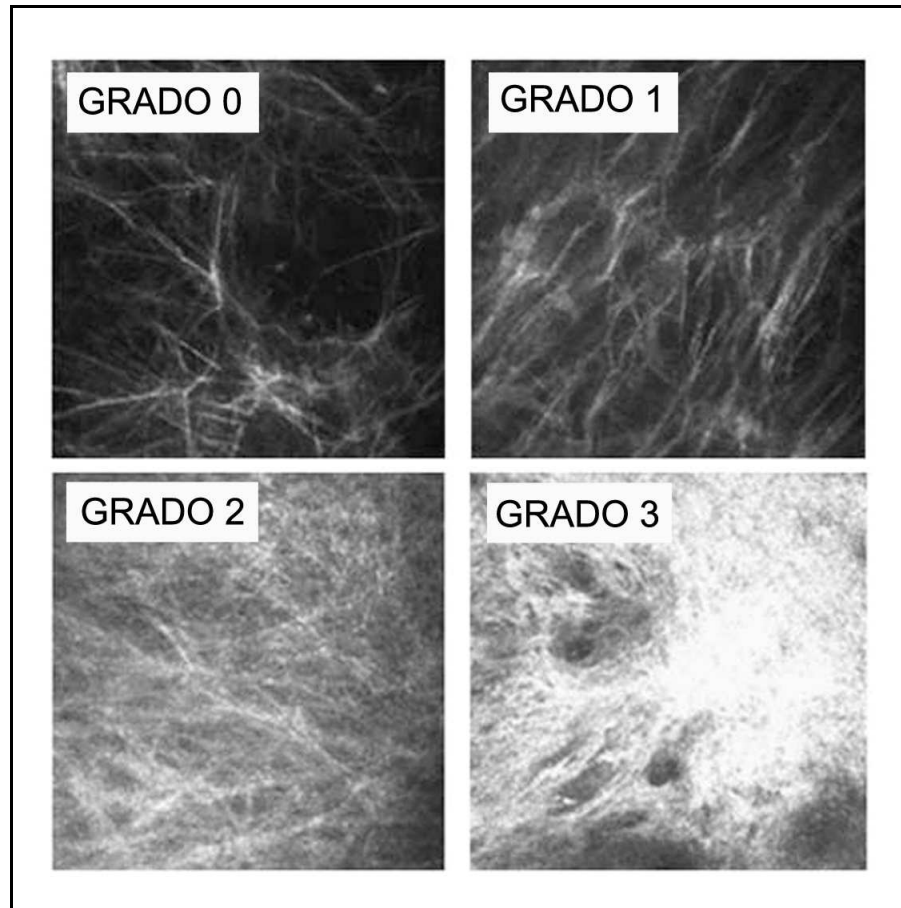


Figura 18 [I vari gradi di connettività attribuiti al connettivo subepiteliale in base alla riflettività]

3d) Analisi Statistica

L'analisi statistica utilizzata in questo lavoro è servita a stabilire quali dei parametri misurati con l'OCT e con la microscopia confocale fossero dirimenti in termini di significatività nella distinzione fra bozze funzionanti e non.

Il Mann-Whitney U Test si è rivelato il test più idoneo in questo tipo di analisi in quanto consente il confronto delle medie di due gruppi di campioni indipendenti in cui non si può supporre una distribuzione di tipo gaussiana. Un ulteriore vantaggio di questo test è che i due campioni in considerazione non devono necessariamente avere lo stesso numero di osservazioni.

L'ipotesi nulla assunta in questo caso è che i due campioni siano stati estratti dalla stessa popolazione (cioè che tra i due non ci sia una differenza statisticamente significativa).

Il valore di P utilizzato è stato 0.05.

Per $P \leq 0.05$ si respinge l'ipotesi nulla. Se P è $>$ di 0.05 possiamo accettare l'ipotesi nulla.

4) RISULTATI

Dei pazienti esaminati 35 erano donne e 51 erano uomini con una età compresa fra i 51 e gli 80 anni.

I valori di pressione endoculare prima dell'intervento variavano fra i 24 ed i 37 mmHg.

In base alle misurazioni tonometriche ottenute gli 86 occhi esaminati sono stati divisi in 2 gruppi: Gruppo 1 (bozze funzionanti) composto da 39 bozze dove l'obiettivo pressorio dopo l'intervento è stato raggiunto; e Gruppo 2 (bozze non funzionanti) composto da 47 bozze nelle quali il tono endoculare non è sceso fino al target pressorio stabilito.

L'esame OCT ha consentito di effettuare una ulteriore classificazione degli occhi esaminati creando delle sottocategorie in base all'aspetto morfologico delle strutture analizzate¹⁷⁻¹⁵. Ognuno di questi gruppi presentava delle caratteristiche peculiari anche all'esame con il microscopio confocale.

Le 39 bozze funzionanti (Gruppo 1) sono state divise in 14 bozze diffuse e 25 bozze cistiche.

Le 47 bozze non funzionanti (Gruppo 2) sono state divise in 10 bozze piatte e 37 bozze incapsulate (Tabella 1).

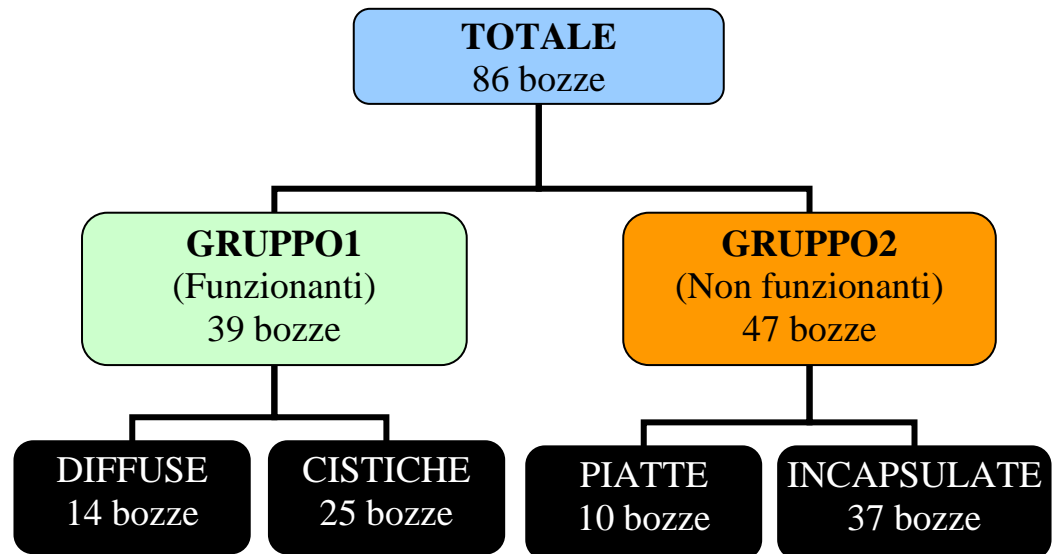


Tabella 1 [Le classificazioni effettuate in base ai valori tonometrici ed in base all'aspetto tomografico delle bozze]

BOZZE DIFFUSE

All'esame con la lampada a fessura queste bozze apparivano molto estese e poco elevate rispetto al piano sclerale.

L'esame tomografico presentava uno spazio iporelettente sopra il flap ristretto ma continuo compreso fra 0.05 e 0.19 mm (media 0.17 ± 0.2); lo spessore della parete della bozza compreso fra 0.15 e 0.26 mm (media 0.20 ± 0.4); la media della riflettività della parete di 1.1 ± 0.1 .

Alla microscopia confocale si apprezzavano microcisti epiteliali diffuse, in media in numero di 28 ± 10.2 per campo; si osservavano inoltre poche fibre connettivali scarsamente arrangiate con una densità media di 1.3 ± 0.3 . In tutte le scansioni il piatto del dispositivo Ex-press risultava ben visualizzabile ed a stretto contatto sia con lo sportello sclerale (superiormente) che con il letto sclerale (inferiormente); a volte era presente una sottile area allungata iporiflettente fra le due strutture (Fig 19).

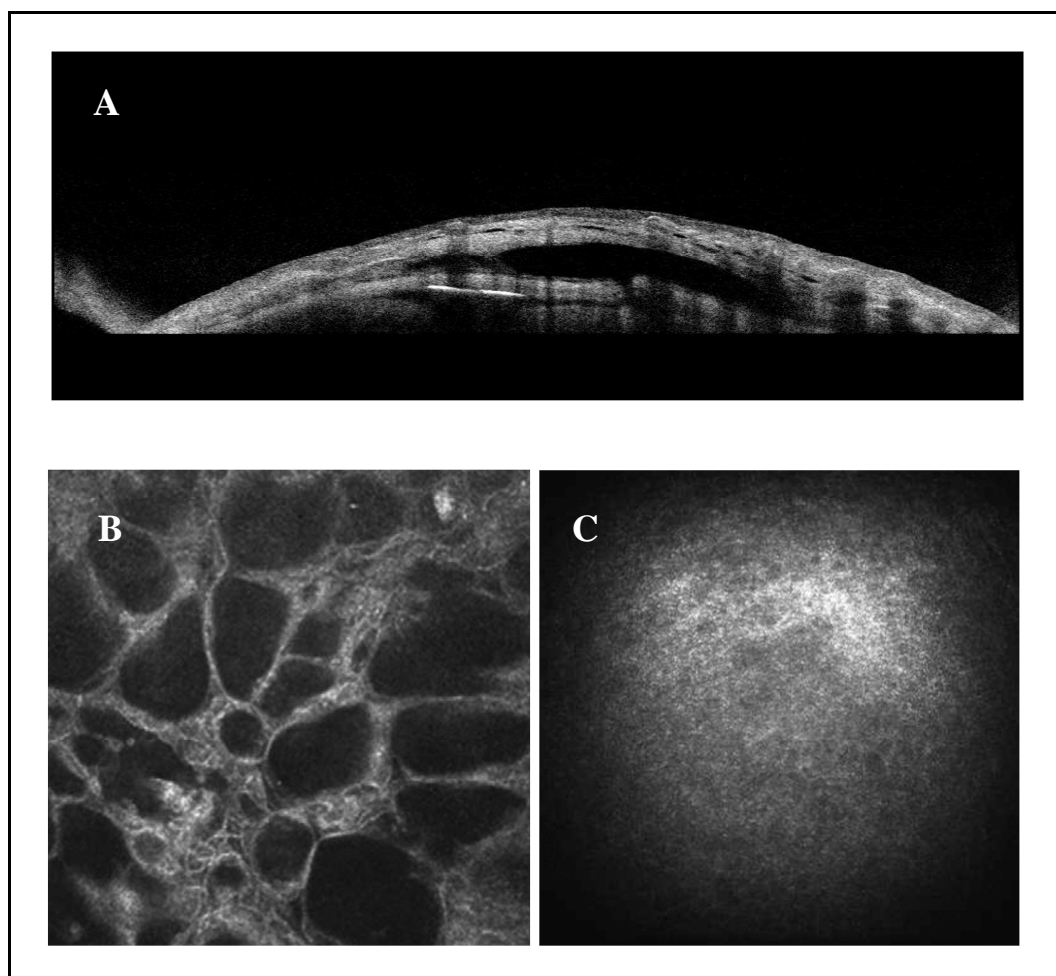


Figura 19 [Bozza diffusa: A) scansione tomografica orizzontale in prossimità del limbus; B) epitelio congiuntivale; C) connettivo congiuntivale]

BOZZE CISTICHE

Alla lampada a fessura apparivano mediamente rilevate rispetto al letto sclerale, con caratteristiche molto variabili per quanto riguarda l'estensione.

All'OCT si apprezzava un accumulo di liquido sopra il flap con altezza variabile da 0.45 a 2.25 mm (media 1.81 ± 0.6), lo spessore

della parete compreso fra 0.12 e 0.44 mm (media 0.29 ± 0.3) con una riflettività media di 1.2 ± 0.3 . Si evidenziavano inoltre multipli spazi iporiflettenti stratificati a più livelli nella parete delle bozza.

Alla microscopia confocale si osservavano numerose microcisti epiteliali (in media 32 ± 0.98 per campo) ed il connettivo risultava scarsamente arrangiato con una densità media di 1.2 ± 0.4 .

Il piatto Express risultava ben visualizzabile al di sotto del flap sclerale e tra la faccia superiore del dispositivo e la faccia inferiore del flap era sempre visibile una sottile area iporiflettente (Fig 20).

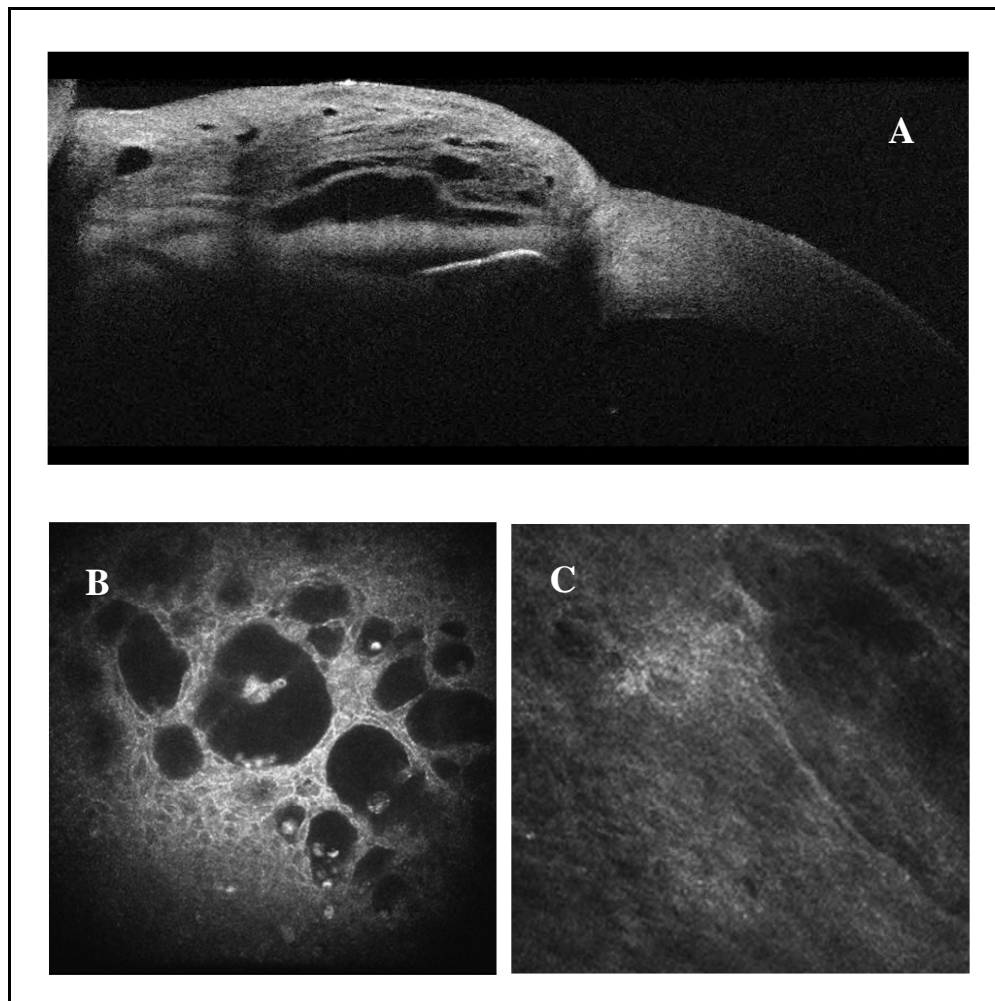


Figura 20 [Bozza cistica: A) sezione tomografica verticale intercettante la cornea; B) epitelio congiuntivale; C) connettivo congiuntivale]

BOZZE INCAPSULATE

Alla lampada apparivano poco estese, rilevate e piuttosto localizzate.

All'OCT si apprezzava un grande accumulo di liquido sopra il flap, altezza compresa fra 1.55 e 2.50 mm (media 1.9 ± 0.4), circondato da

una parete con spessore molto variabile compreso fra 0.29 e 0.52 mm (media 0.38 ± 0.5) e riflettività media di 2.2 ± 0.4 .

Alla microscopia confocale si apprezzavano poche microcisti isolate (in media 19 ± 6.3 per campo) ed il connettivo risultava densamente arrangiato (in media 2.0 ± 0.5).

Il piatto Express nel 35% dei casi non risultava individuabile nelle scansioni orizzontali a causa dell'effetto schermo causato dall'alta riflettività della parete della bozza; in alcuni casi a causa dell'eccessiva altezza della bozza l'immagine non risultava visualizzabile per intero nello schermo (Fig 21).

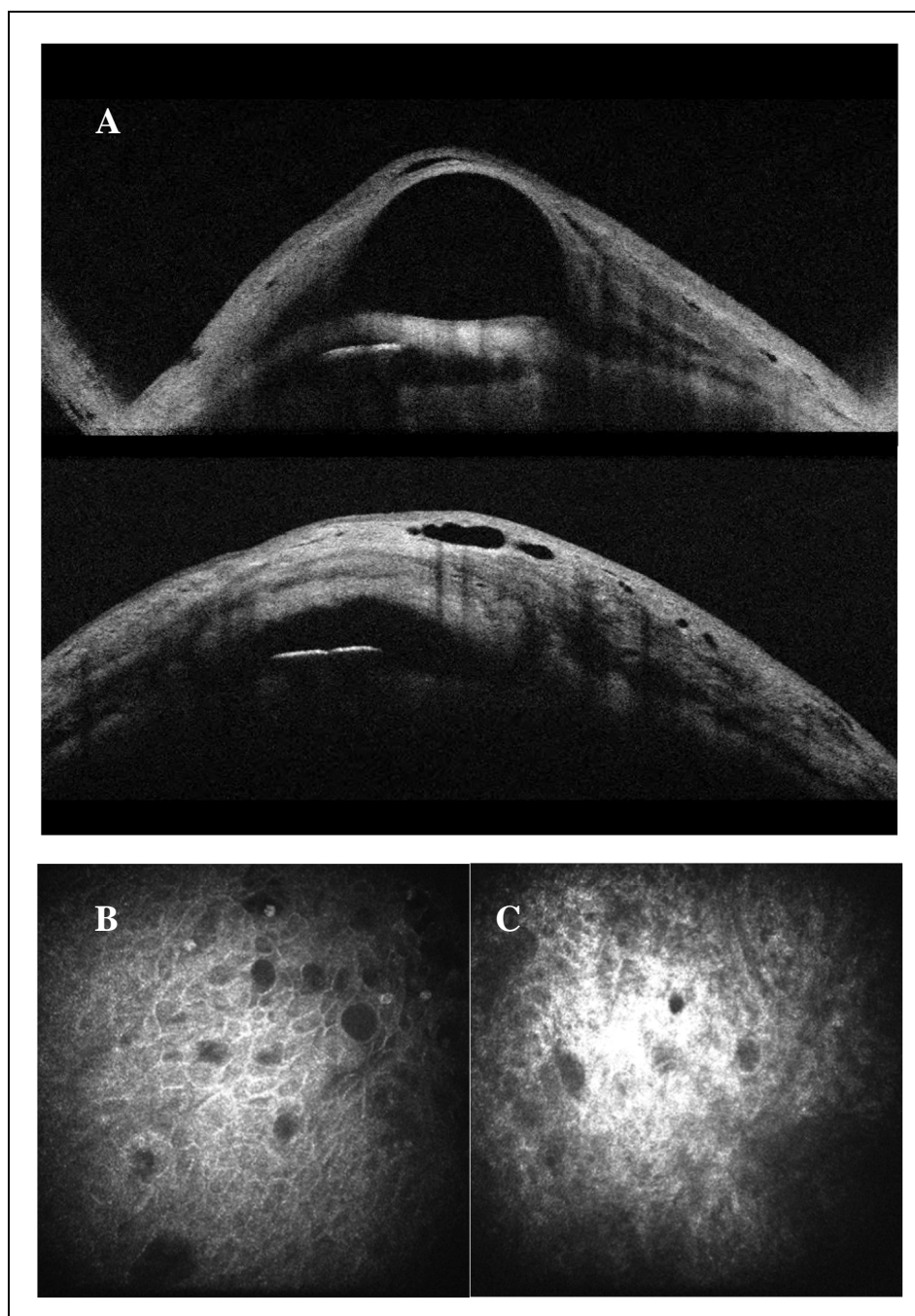


Figura 21 [Bozza incapsulata: A) immagini tomografiche orizzontali che evidenziano la variabilità dello spessore della parete in queste bozze; B) epitelio congiuntivale; C) connettivo congiuntivale]

BOZZE PIATTE

Alla lampada a fessura apparivano poco estese e senza una significativa elevazione rispetto al piano sclerale. All'esame OCT non si apprezzava un vero e proprio strato di liquido sopra il flap oppure era assente, il piatto del dispositivo Ex-press risultava sempre ben visualizzabile e la parete risultava molto spessa (tra 0.32 e 0.48 mm con media di 0.39 ± 0.3) ed iperriflettente (in media 2.7 ± 0.2).

Alla microscopia confocale non si apprezzavano microcisti, il connettivo era densamente organizzato e le fibre connettivali apparivano iperriflettenti (in media 2.5 ± 0.4) (Fig 22).

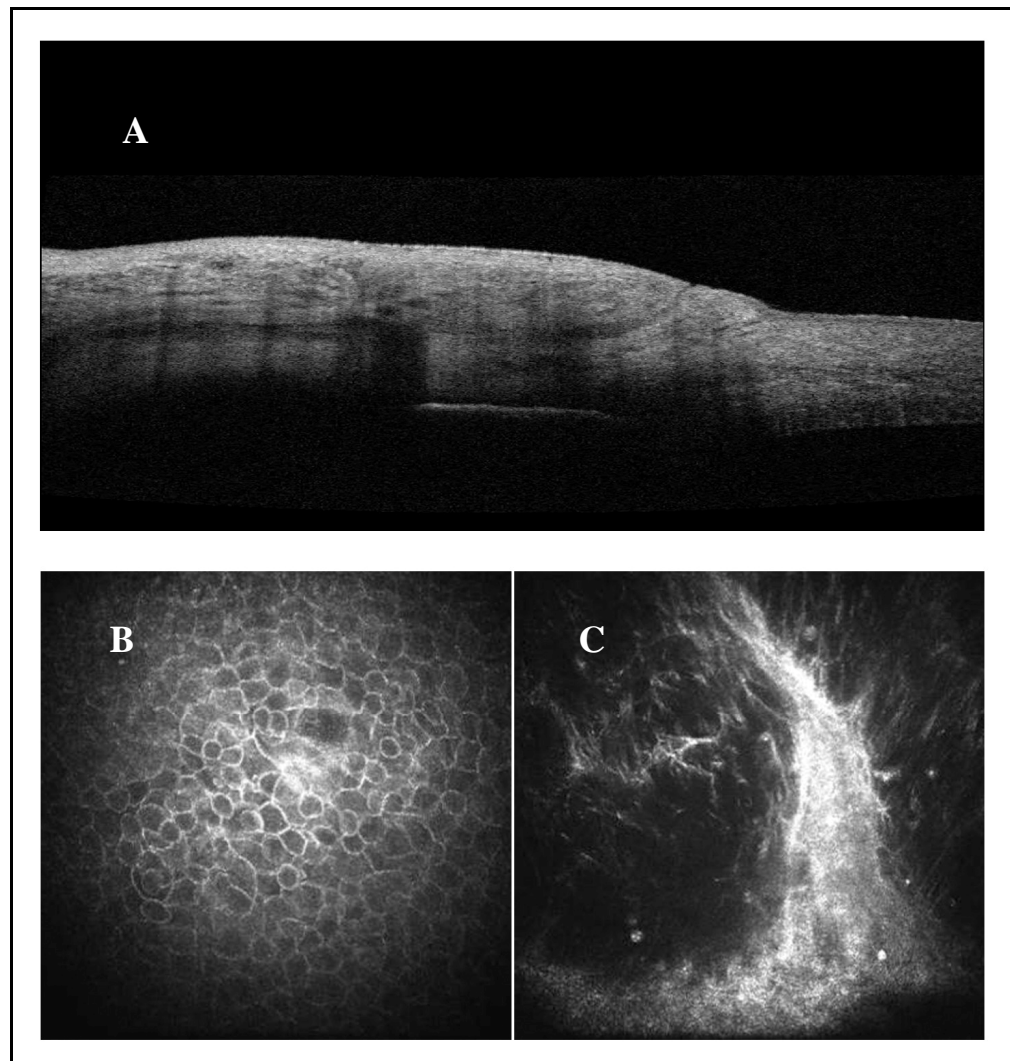


Figura 22 [Bozza piatta: A) immagine tomografica, sezione verticale che intercetta la cornea; B) epitelio congiuntivale; C) connettivo congiuntivale]

I dati relativi alle misurazioni effettuate con l'OCT e la microscopia confocale sono riportati nella Tabella 2. I valori riguardanti l'altezza e lo spessore della parete sono espressi in millimetri (è riportato sia l'intervallo massimo fra le misurazioni che la media con relativa deviazione standard), il numero delle microcisti è riferito alla media

per campo e la riflettività della parete e del connettivo fanno riferimento ai criteri di valutazione enunciati in precedenza.

	PARAMETRI OCT			PARAMETRI CONFOCALE	
TIPO DI BOZZA	Altezza	Spessore parete	Riflettività parete	Numero microcisti	Connettivo
Bozze Diffuse	0.05-0.19 0.17 ± 0.2	0.15-0.26 0.20 ± 0.4	1.1 ± 0.1	28 ± 10.2	1.3 ± 0.3
Bozze cistiche	0.45-2.25 1.81 ± 0.6	0.12-0.44 0.29 ± 0.3	1.2 ± 0.3	32 ± 9.8	1.2 ± 0.4
Bozze incapsulate	1.55-2.50 1.98 ± 0.4	0.29-0.52 0.38 ± 0.5	2.2 ± 0.4	19 ± 6.3	2.0 ± 0.5
Bozze piatte		0.32-0.48 0.39 ± 0.3	2.7 ± 0.2		2.5 ± 0.4

Tabella 2 [Dati acquisiti tramite OCT e microscopia confocale nei vari tipi di bozze]

Nell'analisi statistica dei dati ottenuti con l'OCT, effettuata con il Mann-Whitney *U* Test, sono stati messi a confronto l'altezza della bozza, lo spessore della parete e la riflettività della parete fra il Gruppo 1 (bozze funzionanti) ed il Gruppo 2 (bozze non funzionanti). I risultati ottenuti sono riportati nella Tab. 3. Possiamo osservare come il solo parametro statisticamente significativo in termini di funzionalità della bozza sia la riflettività della parete. L'altezza e lo spessore della bozza non risultano significativi.

PARAMETRI OCT Mann-Whitney <i>U</i> test	FUNZIONANTI	NON FUNZIONANTI	P (significativo ≤ 0.05)
Altezza	1.13 ± 0.8	1.98 ± 0.4	Non significativo
Spessore parete	0.26 ± 0.5	0.38 ± 0.6	Non significativo
Riflettività parete	1.1 ± 0.3	2.3 ± 0.2	< 0.001

Tab 3 [Analisi statistica dei parametri misurati con l'OCT nel confronto fra bozze funzionanti e non funzionanti]

Anche i parametri ottenuti con la microscopia confocale sono stati sottoposti ad analisi statistica; fra i due gruppi sia il numero delle microcisti che la riflettività del tessuto connettivo risultano essere dati significativi per la funzionalità della bozza (Tab 4).

PARAMETRI CONFOCALE Mann-Whitney <i>U</i> test	FUNZIONANTI	NON FUNZIONANTI	P (significativo ≤ 0.05)
Numero microcisti	29.03 \pm 4.5	19 \pm 6.3	0.0012
Densità connettivo	1.2 \pm 0.6	2.3 \pm 0.7	0.0041

Tab 4 [Analisi statistica dei parametri misurati con la microscopia confocale nel confronto fra bozze funzionanti e non funzionanti]

5) *DISCUSSIONE*

L'esame alla lampada a fessura delle bozze post-operatorie unitamente all'UBM per molto tempo hanno rappresentato l'unico modo per valutare la funzionalità e la morfologia di queste strutture. Con l'UBM nel corso degli anni in letteratura sono state valutate numerose bozze filtranti post-trabeculectomia; vari studi riportano come criterio più importante nella valutazione della funzionalità della bozza la sua riflettività¹³: ad una maggiore riflettività corrisponde una minor capacità di filtrazione. Oggi grazie all'OCT del segmento anteriore, siamo in grado di valutare più nel dettaglio e con una metodica non a contatto la struttura interna delle bozze. Studi precedenti, eseguiti anch'essi sulle bozze post trabeculectomia¹⁷⁻¹⁸, evidenziano come caratteristiche principali delle bozze funzionanti la presenza di multipli spazi cistici, una parete sottile ed una bassa riflettività; viceversa le bozze non funzionanti piatte o incapsulate sembrano caratterizzate da una parete più spessa e con una maggiore riflettività. Ad oggi in letteratura non ci sono studi sulle bozze post Ex-press che riportano dati misurati con l'OCT del segmento anteriore. In accordo con quanto osservato da Ciancaglini e Al.¹⁵ nelle bozze post-

trabeculectomia, nel nostro studio non sono emerse differenze significative per quanto riguarda spessore ed altezza nel confronto fra bozze funzionanti e non. In questo lavoro l'elemento più importante in termini di significatività fra i due gruppi invece è risultata essere la riflettività della parete della bozza. Le bozze funzionanti analizzate avevano una riflettività di parete più bassa rispetto a quelle non funzionanti.

La microscopia confocale riveste un ruolo di primo piano nello studio della congiuntiva delle bozze in quanto permette di valutare in maniera molto accurata la loro microarchitettura. La microscopia confocale eseguita in questo lavoro ha evidenziato modifiche strutturali a carico del connettivo e dell'epitelio congiuntivale che concordano con la letteratura¹⁹⁻²⁰. Anche se gli studi di riferimento sono stati eseguiti su bozze post-trabeculectomia¹⁵, i parametri fondamentali nella valutazione della funzionalità risultano essere il numero delle microcisti e la densità del tessuto connettivo. In base ai risultati ottenuti possiamo dire che, per quanto riguarda la casistica di questo lavoro, sia dopo Ex-press che dopo trabeculectomia le bozze con un maggior numero di microcisti tendono a funzionare meglio delle bozze con un basso numero di microcisti. Questo depone a

favore dell'importanza della via di filtrazione transconiuntivale enuncziata in precedenza²¹⁻²².

Da quanto emerso in questo lavoro il tessuto connettivo scarsamente arrangiato e poco riflettente risulta essere correlato ad una maggiore funzionalità della bozza (come nelle bozze post-trabeculectomia¹⁵) viceversa un connettivo iperriflettente e densamente arrangiato sembra maggiormente legato al fallimento dell'intervento. La presenza di un tessuto connettivale più compatto infatti si comporta come un ostacolo alla filtrazione attraverso l'epitelio congiuntivale.

Se incrociamo i dati ottenuti con l'OCT e con la microscopia in vivo, possiamo ipotizzare che un tessuto connettivo più denso, ed arrangiato in maniera più complessa, all'analisi OCT risulti avere una riflettività maggiore. Viceversa una minore riflettività all'OCT correla con un connettivo più lasso e meno compatto.

Quindi possiamo dedurre che minore è la fibrosi subepiteliale della congiuntiva, maggiore è la capacità di filtrazione transconiuntivale della bozza, più alto è il numero delle microcisti epiteliali e più basso è il tono endoculare.

Le sottocategorie evidenziate (Diffuse, Cistiche, Incapsulare e Piatte) hanno consentito di inquadrare in maniera migliore il funzionamento

delle bozze post Ex-press consentendo inoltre di guidare l'approccio chirurgico nei casi di mancata filtrazione.

Con bozze non funzionanti di tipo incapsulato abbiamo eseguito un "needling" per via transcongiuntivale. La procedura di needling infatti consiste nella riapertura delle vie di drenaggio dell'acqueo eseguita mediante un ago da 27 Gauge con il quale si va a scollare la parete della bozza dalle varie aderenze sottocongiuntivali.

Nei casi in cui la mancata filtrazione invece era legata alla presenza di una bozza piatta, che non presentava liquido sopra il flap e con molto tessuto fibroso soprastante, la procedura scelta è stata quella di una "revisione completa" della bozza. In questo caso abbiamo proceduto a riaprire la congiuntiva al limbus ed andando a liberare dalle aderenze fibrose il flap sclerale ed i tessuti circostanti.

In futuro l'utilizzo combinato di queste due tecniche di diagnostica per immagini, unitamente allo sviluppo tecnologico delle stesse, permetterà di capire nuovi meccanismi di filtrazione delle bozze post Ex-press, di ricoprire un ruolo predittivo per quanto riguarda la funzionalità di queste ultime, e di analizzare nel dettaglio tutte le strutture della bozza.

6) BIBLIOGRAFIA

- 1) Colin Cook, FCS, Paul Foster. **Epidemiology of glaucoma: what's new?** *Can J Ophthalmol* 2012;47:223–226
- 2) Foster PJ, Buhrmann R, Quigley HA, Johnson GJ. **The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys.** *Br J Ophthalmol.* 2002;86:238-42.
- 3) Sarah F. Janssen, Theo G.M.F. Gorgels, Wishal D. Ramdas, et Al **The vast complexity of primary open angle glaucoma: Disease genes, risks, molecular mechanisms and pathobiology.** *Progress in Retinal and Eye Research* 2013; 37:31-67
- 4) Stephen A. Obstbaum, George A. Cioffi, Guenther K. Krieglstein, M. Brian Fennerty, Albert Alm, Makoto Araie, Roberto G. Carassa, Erik L. Greve, Roger A. Hitchings, Paul L. Kaufman, Yoshiaki Kitazawa, Prin Rojana Pongpun, Remo Susanna Jr, Martin B. Wax, Thom J. Zimmerman. **Gold standard medical therapy for Glaucoma:Defining the criteria identifying measures for an evidence-based analysis.** *Clinical Therapeutics, December 2004; Volume 26, Issue 12: 2102-2120*
- 5) European Glaucoma Society. **Terminology and guidelines for Glaucoma.** 2008; 3rd edition:117-121
- 6) Paul R Lichter, David C Musch, Brenda W Gillespie, Kenneth E Guire, Nancy K Janz, Patricia A Wren, M.P.H.Richard P Mills, the CIGTS Study Group. **Interim clinical outcomes in the collaborative initial glaucoma treatment study comparing initial treatment randomized to medications or surgery.** *Ophthalmology, November 2001; Volume 108, Issue 11: 1943-1953*

- 7) J.-M. Baumgartner, C.E. Ngondi, J. Bovet, A.G. Chiou.
Chirurgie filtrante dans le glaucome: étude comparative de trois approches chirurgicales. *Journal Français d'Ophthalmologie*, Volume 35, Issue 9; November 2012: 705-715

- 8) Cairns JE. **Trabeculectomy. Preliminary report of a new method.** *Am J Ophthalmol.* 1968 Oct;66(4):673-9

- 9) A. Tenner, W. Jaeger. **Demonstration of the drainage of aqueous humor following various glaucoma operations by means of injection of fluorescein into the anterior chamber.** *Ber Zusammenkunft Dtsch Ophthalmol Ges*, (1977);74:. 853-855

- 10) P.C. Kronfeld. **The chemical demonstration of transconjunctival passage of aqueous after antiglaucomatous operations.** *Am J Ophthalmol*, 35 (1952), pp. 38–45

- 11) Amar N, Labbé A, Hamard P, Dupas B, Baudouin C.
Filtering blebs and aqueous pathway an immunocytological and in vivo confocal microscopy study. *Ophthalmology.* 2008 Jul;115(7):1154-1161

- 12) Freedman J. **What is new after 40 years of glaucoma implants.** *J Glaucoma.* 2010 Oct-Nov;19(8):504-8

- 13) Yamamoto T, Sakuma T, Kitazawa Y. **An ultrasound biomicroscopic study of filtering blebs after mitomycin C trabeculectomy.** *Ophthalmology.* 1995 Dec;102(12):1770-6.

- 14) Napoli PE, Zucca I, Fossarello M. **Qualitative and quantitative analysis of filtering blebs with optical coherence tomography.** *Can J Ophthalmol.* 2014 Apr;49(2):210-6

- 15) Ciancaglini M, Carpineto P, Agnifili L, Nubile M, Lanzini M, Fasanella V, Mastropasqua L. **Filtering bleb functionality: a clinical, anterior segment optical coherence tomography and in vivo confocal microscopy study.** *J Glaucoma.* 2008 Jun-Jul;17(4):308-17

- 16) Labbé A, Dupas B, Hamard P, Baudouin C. **In vivo confocal microscopy study of blebs after filtering surgery.** *Ophthalmology.* 2005 Nov;112(11):197-9

- 17) Leung CK, Yick DW, Kwong YY, Li FC, Leung DY, Mohamed S, Tham CC, Chung-chai C, Lam DS. **Analysis of bleb morphology after trabeculectomy with Visante anterior segment optical coherence tomography.** *Br J Ophthalmol.* 2007 Mar;91(3):340-4

- 18) Singh M, Chew PT, Friedman DS, et al. **Imaging of trabeculectomy blebs using anterior segment optical coherence tomography.** *Ophthalmology.* 2007;114:47–53.

- 19) Messmer EM, Zapp DM, Mackert MJ, et al. **In vivo confocal microscopy of filtering blebs after trabeculectomy.** *Arch Ophthalmol.* 2006;124:1095–1103.

- 20) Guthoff R, Klink T, Schlunck G, et al. **In vivo confocal microscopy of failing and functioning filtering blebs: results and clinical correlations.** *J Glaucoma.* 2006;15:552-558.
- 21) Galin MA, Baras I, McLean JM. **The mechanism of external filtration.** *Am J Ophthalmol.* 1966;61:63–68.
- 22) Teng CC, Chi HH, Katzin HM. **Histology and mechanism of filtering operations.** *Am J Ophthalmol.* 1959;47:16–33.